

10/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007460883

WPI Acc No: 1988-094817/198814

Arachidonic acid prepn. - by culturing *Mortierella* microbe showing arachidonic acid productivity, and recovering the acid from microbial body

Patent Assignee: SUNTORY LTD (SUNR)

Inventor: SHIMIZU S; SHINMEN Y; YAMADA H

Number of Countries: 016 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 63044891	A	19880225	JP 8715920	A	19870128	198814 B
EP 276541	A	19880803	EP 87308690	A	19870930	198831
EP 276541	B1	19930324	EP 87308690	A	19870930	199312
US 5204250	A	19930420	US 8722820	A	19870306	199317
			US 90588473	A	19900926	
DE 3785023	G	19930429	DE 3785023	A	19870930	199318
			EP 87308690	A	19870930	
ES 2039451	T3	19931001	EP 87308690	A	19870930	199344
JP 95034752	B2	19950419	JP 8715920	A	19870128	199520
EP 276541	B2	19980826	EP 87308690	A	19870930	199838
CA 1340433	C	19990316	CA 531638	A	19870310	199929

Priority Applications (No Type Date): JP 8671270 A 19860331; JP 8715920 A 19870128

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; A3...8930; EP 155420; EP 207475; EP 223960; JP 52064484; JP 59130191; JP 61177990; No-SR.Pub; JP 6177990

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

JP 63044891	A		7		
-------------	---	--	---	--	--

EP 276541	A	E			
-----------	---	---	--	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

EP 276541	B1	E	9	C12P-007/64	
-----------	----	---	---	-------------	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

US 5204250	A		5	C12P-007/64	Cont of application US 8722820
------------	---	--	---	-------------	--------------------------------

DE 3785023	G			C12P-007/64	Based on patent EP 276541
------------	---	--	--	-------------	---------------------------

ES 2039451	T3			C12P-007/64	Based on patent EP 276541
------------	----	--	--	-------------	---------------------------

JP 95034752	B2		5	C12P-007/64	Based on patent JP 63044891
-------------	----	--	---	-------------	-----------------------------

EP 276541	B2	E		C12P-007/64	
-----------	----	---	--	-------------	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

CA 1340433	C			C12P-007/64	
------------	---	--	--	-------------	--

Abstract (Basic): JP 63044891 A

Method comprises (a) culturing the microbe which belongs to *Mortierella* and shows the productivity for arachidonic acid, for forming arachidonic acid or the lipid contg. arachidonic acid and (b) recovering arachidonic acid from microbial body.

Pref. *M. elongata* IFO 8570, *M. exigua* IFO 8571, *M. hygrophila* IFO 5941, etc. can also be used. As carbon source glucose, fructose, soluble starch, molasses, etc. can be used and as nitrogen source peptone, yeast, malt or beef-extract, cs1, etc. can be used. For increasing the yield of arachidonic acid it is pref. to add hydrocarbon (e.g. hexa or octadecane, etc.), fatty acid (e.g. oleic- or linlic-acid, etc.), its salt or oil and fat (e.g. olive-, cotton seed- or coconut-oil, etc.) in culture medium before or during fermentation continuously or intermittently.

USE/ADVANTAGE - Microbes belonging to *Penicillium*, *Aspergillus*, etc. can produce arachidonic acid, but the productivity for arachidonic acid of the microbe belonging to *Mortierella* has not been known. *Mortierella elongata* SAM 0219 (FERM P-1239) is sepd. from soil and by using it arachidonic acid can be prepd. with high yield using

inexpensive culture medium in a short fermenting time.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): EP 276541 B

A process for production of arachidonic acid, comprising culturing a microorganism, belonging to the genus *Mortierella* and capable of producing arachidonic acid, to produce arachidonic acid or a lipid comprising arachidonic acid, and recovering the arachidonic acid, wherein the culturing is carried out in the presence of a hydrocarbon, fatty acid or a salt thereof, or a combination thereof.

(Dwg. 0/0)

Abstract (Equivalent): US 5204250 A

Prodn. of arachidonic acid or a lipid contg. arachidonic acid comprises propagation of *Mortierella elongata* IFO 8570 or SAM-0219 (FERM BP-1239), *M. exigua* IFO 8571 or *M. hygrophila* IFO 5941 in the presence of the usual nutrients and one or more precursors, e.g. n-hexadecane, n-octadecane, oleic acid salts, linolenic acid salt, linoleic acid salts, olive oil, corn oil, coconut oil, soyabean oil and linseed oil; then recovery of the arachidonic acid or its lipid cpd. from the medium. ADVANTAGE - The process is more rapid than previous fermentation methods and gives improved yields.

(Dwg.0/0)

Derwent Class: B05; D16; E17

International Patent Class (Main): C12P-007/64

International Patent Class (Additional): C12N-001/38; C12P-001/02;

C12P-007/40; C12R-001/64; C12P-007/64; C12R-001-645

?map anpryy temp s10

1 Select Statement(s), 2 Search Term(s)

Serial#TD430

?exs

Executing TD430

2 AN=JP 8671270

2 AN=JP 8715920

S11 2 AN=JP 8671270 + AN=JP 8715920

?s s11 not s10

2 S11

1 S10

S12 1 S11 NOT S10

?t 12/7

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-34752

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)4月19日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/64		7432-4B		
// (C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:645)				

発明の数 2 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願昭62-15920

(22) 出願日 昭和62年(1987)1月28日

(65) 公開番号 特開昭63-44891

(43) 公開日 昭和63年(1988)2月25日

(31) 優先権主張番号 特願昭61-71270

(32) 優先日 昭61(1986)3月31日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 日本農芸化学会 昭和61年度大会講演要旨集 昭和61年3月10日 社団法人日本農芸化学会発行 第502ページに発表

微生物の受託番号 FERM BP-1239

(71) 出願人 999999999

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72) 発明者 新免 芳史

京都府乙訓郡大山崎町円明寺島居前8の1
S-304

(72) 発明者 山田 秀明

京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

(72) 発明者 清水 昌

京都府京都市中京区西の京伯楽町14

(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外5名)

審査官 谷口 博

(54) 【発明の名称】 アラキドン酸及びこれを含有する脂質の製造方法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 モルティエラ (Mortierella) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法。

【請求項2】 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項4】 モルティエラ (Mortierella) 属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキ

2

ドン酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項5】 培養開始前の培地に炭化水素、脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項6】 培養中の培養液に脂肪酸もしくは脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10. 【産業上の利用分野】

本発明は醗酵法によるアラキドン酸及びこれを含有する脂質の製造方法に関する。

【従来の技術】

従来から、微生物によるアラキドン酸の生産方法としては、炭素源として、炭水化物、又は炭化水素を用い、微生物として、ペニシリウム (Penicillium) 属、アス

ペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロードトルラ (*Rhodotula*) 属、又はフザリウム (*Fusarium*) 属に属する微生物を使用する方法が報告されている (特公昭56-19231, 56-19232, 56-19233を参照のこと)。

しかしながら、いずれの方法においても収量が低く、または培養時間が長く、あるいは、工程が複雑である。また、モルティエラ (*Mortierella*) 属の微生物を用いるアラキドン酸の製造方法は知られていない。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明は、従来アラキドン酸を生産する能力を有することが知られていなかったモルティエラ属微生物を使用して、安価な常用の培地を用いて、従来法より短い培養時間で、高収率で、しかも単純な工程でアラキドン酸及びこれを含有する脂質を製造することができる方法を提供しようとするものである。

〔問題点を解決するための手段〕

上記の目的はモルティエラ属に属してアラキドン酸生産能を有する微生物を培養液してアラキドン酸、又はアラキドン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてアラキドン酸を採取することを特徴とするアラキドン酸の製造方法；及びモルティエラ属に属しアラキドン酸生産能を有する微生物を培養してアラキドン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするアラキドン酸を含有する脂質の製造方法により達成される。

〔具体的な説明〕

本発明においては、モルティエラ属に属し、アラキドン酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物として、例えばモルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IFO 8570、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IFO 8571、モルティエラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IFO 5941等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、財団法人醸造研究所からなんら制限なく入手することができる。

また、本発明者らが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。

次に、上記の菌株 SAM 0219 (微工研条寄第1239号) の菌学的性質を記載する。

各培地における生育状態

培養条件: 25℃、暗黒下

1. 麦芽エキス寒天培地

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーは直径28-31mm、培養5日目のコロニーは直径65-72mm、コロニーは浅裂状を呈する、気菌糸の発達は乏しい、胞子のう胞子の形成は良好、胞子のう柄は気菌糸より生じる、ニンニクに類似した臭いあり。

2. バレイショ・ブドウ糖寒天培地

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーは直径27-31mm、培養5日目のコロニーは直径75-80mm、コロニー

一はバラの花状を呈する、コロニー中心部で気菌糸が著しく発達する、コロニーの裏側は黄白色あるいは黄色、胞子のう胞子の形成は不良、ニンニクに類似した臭いあり、臭いはやや強い。

3. ツアベック寒天培地

コロニーの生育は比較的良好、培養2日目のコロニーの直径は22-24mm、培養5日目のコロニーの直径は50-53mm、気菌糸の発達は乏しい、気菌糸が密にからまりあうことがある。胞子のう胞子の形成は非常に良好、胞子のう柄は気菌糸より生じる。ニンニクに類似した臭いあり。

4. LCA寒天培地 (培地の調製方法は、三浦宏一郎、工藤光代著“水生不完全菌のための一寒天培地”日本菌学会会報11巻、116-118頁、1970年に従った)

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーの直径は27-29mm、培養5日目のコロニーは直径64-66mm、コロニーは浅裂状を呈する、気菌糸の発達はコロニーの中心部を除いて乏しい、胞子のう胞子の形成は良好。胞子のう柄は気菌糸より生じる。ニンニクに類似した臭いあり。

検鏡観察

各培地の検鏡標本およびコロニーの直接検鏡で、胞子のう柄、胞子のう柄の分岐の仕方、胞子のう、胞子のう胞子などを観察した。

胞子のう柄は長さ87.5-320 μ m、幅は基部で3-7.5 μ m、先端に向けて先細り、1.0-2.5 μ mとなる。胞子のう柄はしばしば基部で分岐する。胞子のうは球形、直径15-30 μ m、内部に多数の胞子のう胞子を含む、離脱後やや不明瞭なカラーを残す。胞子のう胞子は楕円形、希に腎臓形、表面は平滑、7.5-12.5 \times 5-7.5 μ m、厚膜胞子は比較的多数形成される。単独、希に連鎖することがある。時に数本の菌糸を周囲に出すことがある。楕円形または球形、12.5-30 \times 7.5-15 μ m。または直径12.5-15 μ m。接合胞子は観察されない。

3. 生理的性質

最適生育条件

pH: 6-9

温度: 20-30℃

生育の範囲

pH: 4-10

温度: 5-40℃

以上の菌学的諸性質に従い本発明の菌株 (SAM-0219) の分類学的位置の検索を、J. A. von Arx, "The Genera of Fungi sporulating in Pure Culture," 3rd ed., J. Cramer, 1981およびK. H. Domsch, W. Gams, & T. -H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980に準拠して求めると、胞子のう柄の先端に球状の胞子のうを形成する、柱軸を持たない、胞子のう胞子に付属糸がない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、ということから本菌株は *Mortierella* 属に属する真菌であ

ると考えられる。

そこで、W. Gams, "A key to the species of Mortierella. Persoonia 9, 381-391, 1977に準拠して既知のMortierella属の種類と菌学的諸性質を比較すると、本菌株はコロニーがビロード状でない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、胞子のう柄が長さ87.5-320 μ mで分岐は下部でのみ生じ、葡萄の房状に分岐しない、胞子のうは内部に多数の胞子のう胞子を含む、ということからMortierella属Mortierella亜属 (Sugem. Mortierella) Hygrophila節 (Sect. Hygrophila) に含まれると考えられる。Hygrophila節には22種が含まれている。本菌株とこれら22種と菌学的諸性質を比較すると、本菌株はMortierella zychae, M. elongatula, およびM. elongataの3種に類似すると考えられる。そこで、K. H. Domsch, W. Gams, & T. -H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi, Academic Press, 1980, およびW. Gams, "Some new or noteworthy species of Mortierella, Persoonia 9, 111-140, 1976, およびG. Linnemann, "Mortierella Coemans 1863. H. Zycha & R. Siepmann. "Mucorales Eine Beschreibung Aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. "pp. 155-241, J. Cramer, 1969を参考にして、本菌株とこれら3種と菌学的諸性質を比較した。本菌株は、M. zychaeとは胞子のう柄の長さで基部の幅、胞子のうの大きさで、明瞭に異なる。M. elongatulaとは胞子のう柄の形態と大きさで、明瞭に異なる。M. elongataとは胞子のう柄がやや短い、厚膜胞子の形態が楕円形または亜球形で希に連鎖することがあり、さらに厚膜胞子がときに数本の菌糸を周囲に出す、という点で異なるが、本発明者らはこのような差異は本菌株をMortierella elongataと別種であるとするには十分でないと判断した。そこで、本発明者らは本菌株をMortierella elongata SAM 0219と同定した。SAM 0219株は昭和61年3月19日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 (FRI) に受託番号 FERM BP-1239として寄託されている。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものがいずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステイブリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硝酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1-30重

量%、好ましくは1-10重量%、窒素源は0.01-5重量%、好ましくは0.1-2重量%の濃度とするのが良い。又、培養温度は5-40℃、好ましくは20-30℃とし、培地のpHは4-10、好ましくは6-9として、通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行なう。培養は通常2-10日間行う。

固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50-100重量%の水を加えたふすま、もみがら、来ぬか等を用い、5-40℃、好ましくは20-30℃の温度において、3-14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。アラキドン酸の生産量を増加せしめるためには、培地中にヘキサデカンもしくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸もしくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩；又はオリーブ油、綿実油もしくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて存在せしめるのが好ましい。これらの添加物は培養開始前の培地又は培養中の培養液に添加することができる。これらの添加物は一度に添加することもでき、又は連続的に、もしくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。培養開始前においては炭化水素、脂肪酸もしくはその塩、又は油脂類の添加が好ましく、培養中においては脂肪酸もしくはその塩、又は油脂類の添加が好ましい。

このように培養して、菌体内に、アラキドン酸を含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、次のようにしてアラキドン酸の採取を行なう。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出や、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のアラキドン酸を含有した脂質が得られる。

また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び/又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、アラキドン酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを、直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えばアラキドン酸メチルとして分離するのが好ましい。このようなエステルにすること

により、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸等（これらも、アラキドン酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、アラキドン酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸5%~10%、BF₃-メタノール10%~50%等により、室温にて1~24時間処理するのが好ましい。

前記の処理液からアラキドン酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶剤で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルから成る混合物が得られる。この混合物中には、目的とするアラキドン酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等が含まれている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物からアラキドン酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法等を、単独で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離されたアラキドン酸メチルからアラキドン酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

また、アラキドン酸をそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2~3時間）した後、この分液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1.

グルコース5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び表芽エキス0.3%を含む培地（pH6.0）50mlを500ml容坂口フラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタSAM 0219（FERM BP-1239）1白金耳を接種し、レシブロシェーカー（110rpm）により28℃で5日間振盪培養した。培養後、濾過にて菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥した。これにより、1.3gの乾燥菌体を得た。この菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いるBligh & Dyerの抽出法によって総脂質を抽出したところ、320mgの脂質が得られた。この脂質を無水メタノール-塩酸（95:5）を用いて20℃にて3時間処理してアラキドン酸のメチルエステル化を行なった。これをエーテルで抽出して200mgの脂肪酸メチルを得た。この脂肪酸メチルの組成はガスクロマトグラフィーによる分析で、パルミチン酸メチル9%、ステアリン酸メチル2%、オレイン酸メチル32%、リノール酸メチル9%、γ-リノレン酸メチル10%、アラキドン酸メチル20%、その他17%であることが

認められた。この混合脂肪酸メチルをカラムクロマトグラフィーによって分離し、アラキドン酸メチル画分を分取し、ロータリーエバポレーターによって溶媒を留去した結果、25mgの精製されたアラキドン酸メチルを得た。本標品と市販のアラキドン酸メチル標準サンプルについて、ガスクロマトグラフィー分析、高速液体クロマトグラフィー分析及び質量分析によって比較を行なったところ、両者は、いずれの分析においても一致した。精製前及び精製後の「アラキドン酸メチル」量は培地当り、それぞれ0.84mg/ml、0.50mg/ml、乾燥菌体当り、それぞれ32mg/g、19mg/gであった。

実施例2

実施例1と同じ組成の培地5ℓを15ℓジャーファーマンターに仕込み、120℃で40分間殺菌後、モルティエラ・エロンガタSAM 0129（FERM EP-1239）の前培養液200mlを接種した。30℃、通気量0.5v. v. m. で3日間通気攪拌培養を行ない、得られた湿菌体360g（乾燥重量110g）について、実施例1と同様に抽出、加水分解、メチルエステル化を行なったところ、総脂質29g、混合脂肪酸メチル18gを得た。このものの組成は、パルミチン酸メチル8%、ステアリン酸メチル1%、オレイン酸メチル29%、リノール酸メチル12%、γ-リノレン酸メチル11%、アラキドン酸メチル22%、その他17%であることが認められた。アラキドン酸メチルの生成量は培地当り、0.79g/ℓ、乾燥菌体当り36mg/gであった。又、培養終了後、濾過によって得られた培養濾液4,350mlを乾燥後、実施例1と同様に抽出、加水分解、メチルエステル化を行なったところ、25%のアラキドン酸メチルを含む混合脂肪酸メチル156mgを得た。

実施例3

モルティエラ エキシグア（*Mortierella exigua*, IFO 8571）、及びモルティエラ ヒグロフィラ（*Mortierella hygrophila*, IFO 5911）について実施例1と同様な操作を行なったところ、それぞれ72mg、95mgの脂肪酸メチルを得た。これらの脂肪酸メチル中に含まれるアラキドン酸メチルを単離・精製したところ、それぞれ12mg、及び20mgであった。

実施例4

グルコース2%、酵母エキス1%、Tween 20 0.2%、及び種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、又は油脂0.5%を含む培地（pH6.0）20mlを100ml容マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタ SAM 0129（FERM BP-1239）1白金耳を接種し、ロータリーシェーカー（200rpm）により28℃で5日間培養した。得られた菌体について、実施例1と同様に抽出、加水分解、及びメチルエステル化を行なった。培地に添加した種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、及び油脂それぞれについて、得られた乾燥菌体重量、総脂質量、総脂肪酸メチル量、アラキドン酸メチル含量、及び培地当り

のアラキドン酸メチル生成量は下表のようになった。

添加物	乾燥 菌体 重量 [mg]	総脂 質量 [mg]	総脂 肪酸 メチ ル量 [mg]	アラキ ドン酸 メチル 含量 [%]	アラキド ン酸の培 地当り生 成量 [mg/ml]
オクタデカン	330	95	88	20	0.88
オレイン酸ナトリウム	290	81	64	25	0.80
リノール酸ナトリウム	300	96	83	19	0.79
オリーブ油	430	130	113	24	1.36
綿実油	420	118	97	23	1.12
ヤシ油	380	98	78	25	0.98
無添加	300	85	68	22	0.75

頻準培地に炭化水素、脂肪酸、油脂類などを添加することにより、対照無添加区よりも、アラキドン酸生成量は10~80%上昇した。

実施例5

グルコース2%、及び酵母エキス1%を含む培地 (pH6.0) 20mlを100ml容マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (FERM 20 BP-1239) 1白金耳を接種し、ロータリーシェーカー (200rpm) により28℃で4日間培養後、種々の脂肪酸ナトリウム又は油脂100mgを120℃で15分間殺菌後、添加し、さらに同様にして2日間培養し。得られた菌体につ

いて、実施例1と同様に抽出、加水分解、及びメチルエステル化を行なった。培地に添加した種々の、脂肪酸ナトリウム、及び油脂それぞれについて、得られた乾燥菌体当り、及び培地当りのアラキドン酸メチル生成量は下表のようになった。

添加物	アラキドン酸	
	[mg/g]	[mg/ml]
オレイン酸ナトリウム	46	0.79
リノール酸ナトリウム	47	0.80
リノレン酸ナトリウム	54	0.76
オリーブ油	44	0.96
大豆油	53	1.12
アマニ油	48	0.95
無添加	49	0.74

培養途中 (培養4日後) に、脂肪酸、油脂類などを添加することにより、対照無添加区よりも、アラキドン酸生成量は10~60%上昇した。